

session

(2)

L1 ANSWER 1 OF 1 WPIX COPYRIGHT 2004 THE THOMSON CORP on STN
ACCESSION NUMBER: 1975-31433W [19] WPIX
TITLE: Diffructose dianhydride low-calorie sweetener - prepared
from inulin (extracts) using Arthrobacter ureafaciens.
DERWENT CLASS: B03 D13 E13
PATENT ASSIGNEE(S): (KAKE) KAKEN YAKU KAKO KK
COUNTRY COUNT: 1
PATENT INFORMATION:

PATENT NO	KIND	DATE	WEEK	LA	PG	MAIN	IPC
JP 49117688	A	19741111	(197519)*				<--
JP 56026400	B	19810618	(198129)				

PRIORITY APPLN. INFO: JP 1973-31086 19730317
INT. PATENT CLASSIF.: C12N009-24; C12P019-14; C12R001-06
BASIC ABSTRACT:

JP 49117688 A UPAB: 19930831

Diffructose dianhydride (I), used as a low-calorie is produced from inulin (II) or a plant extract containing (II) using Arthrobacter ureafaciens. In

an

example, 200 g of sliced bundock was boiled with 500 ml water for 1 hr. and the extract was filtered. A. ureafaciens was cultured on the sterilised extract at 37 degrees C for 6 days. The culture filtrate was boiled for 10 min., treated with 20 g baker's yeast for 2 hrs., an filtered.

(I) was adsorbed onto active C, eluted with 5% EtOH, and concentrated to

dryness yielding 0.5 g Sweetness of (I) is approx. half that of fructose; it has no reducing activity and yields fructose by hydrolysis. The m. pt. is 162 degrees C and the sp. rotation at 136 degrees is a 15D.

FILE SEGMENT: CPI

FIELD AVAILABILITY: AB

MANUAL CODES: CPI: B06-A02; B07-A02; B12-J01; D03-H01A; E06-A03



(2,000円)

特許願 (特許法第30条第1項の規定による特許出願)

昭和48年3月17日

特許庁長官 三宅 幸夫 殿

1 発明の名称

ジフルクトース・ジアンヒドリドⅢの製造法

2 発明者

住 所 大阪府豊中市刀根山4の4
氏 名 田 中 國 治 ほか2名

3 特許出願人

住 所 東京都中央区日本橋本町4の7
名 称 科研薬化工株式会社
代表者 肥 高 恵 造

4 代理人

住 所 大阪市北区豊基町2の28 新千代出ビル
氏 名 (6522) 弁護士 朝 日 宗 宗 太

5 添付書類の目録

(1) 明細書

1 通 方式 (大)

(1)

48-031036

明 細 書

1 発明の名称

ジフルクトース・ジアンヒドリドⅢの製造法

2 特許請求の範囲

イヌリンまたはイヌリン含有植物抽出液を原料とし、アースロバクター・ウレアファシエンズに属する細菌またはその産生する酵素を利用することを特徴とするジフルクトース・ジアンヒドリドⅢの製造法。

3 発明の詳細な説明

本発明はイヌリンまたはイヌリン含有植物抽出液より微生物またはその産生する酵素を利用してジフルクトース・ジアンヒドリドⅢ(以下DFAⅢという)を高収率で製造する方法に係る。

DFAⅢは次式で示される構造を有する二糖類であり、

(1)

① 日本国特許庁

公開特許公報

① 特開昭 49-117688

④ 公開日 昭49.(1974)11.11

② 特願昭 48-31086

② 出願日 昭48.(1973)3.17

審査請求 未請求 (全5頁)

庁内整理番号

② 日本分類

6760 49

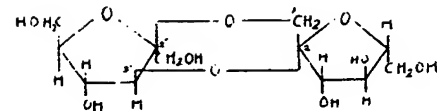
7138 44

7025 49

3601D522

16 E44

24 K2



ジ-D-フルクトフラノース1,2':2,3'ジアンヒドリド

ジャクソン(Jackson)ら(Bur-Stand.-J.-Res., 6, 709, 1951 参照)により単離同定されている。この物質は相当の甘味を有し、同時に前記構造からも推定されるように他の糖類と比較して安定であり、動物体内では代謝されない。したがってノンカロリー甘味剤として注目されているものであり、糖尿病用もしくは美容食用などの用途に有用である。

イヌリンはフルクトースのみを構成糖とする多糖類である。ジャクソンらはいかかるイヌリンの酸による加水分解物からDFAⅢを単離しているが、その収率は2%弱であり、ほとんどがフルクトースである。したがっていかかるイヌリンの酸分解法は、少なくともDFAⅢの製造法としては適切なものではない。

本発明者らはこれらの点を解決すべく種々研

特開昭49-117688-2

究を重ねた結果、ある種の微生物を用いることによりイヌリンおよびイヌリン含有植物抽出液より高収率でDFAⅡが見られることを見出した。

この菌は兵庫県明石市小久保の土壌より分離されたもので通常のイヌラーゼのようないヌリンをフルクトースまで直接分解する作用を有する酵素とは異なる型のイヌリン分解酵素を産生する。しかしてこの菌またはこの菌が産生するイヌリン分解酵素によりイヌリンを消化することによつてDFAⅡを高収率でうる事ができる。この菌種（仮称7116菌）はまた微生物保管委託申請受理番号第1969号のもとに工業技術院微生物工業技術研究所に委託申請されている。以下7116菌の菌学的性質を列挙する。

(1) 形態的性質

形態：0.1～0.2×1.0～1.5μの桿菌

孢子：形成しない

鞭毛：なし

グラム染色：弱い陽性

抗酸性：なし

(3)

ース、フラクトース、ガラクトース、ラクトース、マルトース、サツカーロース、トレハロース、ラフィノース、ソルビット、イノシット、グリセロール、サリシン、α-メチルグルコシッド、イヌリン、デキストリン、澱粉、セルロース

アセチルメチルカルビノールの生成：なし

澱粉の分解性：なし

硝酸塩の還元性：あり

アンモニアの生成：なし

メチルレッド反応：陰性

クエン酸の利用性：あり（クリステンセン培地）

アンモニウム塩の利用性：あり（フツカ培地）

メチレンブルーの還元性：なし

2,4-ジクロロフェノールインドフェノールの還元性：あり

カゼインの分解性：あり

カタラーゼの生成：あり

以上の諸性状にしたがい、バーヂェイのマニアル・オブ・バクテリアイデニフィケーション（Barry's Manual of Determinative Bacteriology）、第7版（1957）により検索すると本菌はグラム陽性の桿菌で、好気性で、生ずるなく、カタラーゼを産生し、アノカーミ

(2) 培養的性質

肉汁セフチン穿刺培養：液化する

寒天凝結：円形 丘状、平滑、全円、光沢あり、バター状、不透明、鈍い黄色

寒天斜面：中等度の生育、糸状、光沢あり、バター状、鈍い黄色

肉汁：中等度の生育

ジャガイモ：中等度の生育

リトマスミルク：不変

BODミルク：不変

(3) 生理的性質

好気性

30℃で良好な生育を示す

インドールの生成：なし

硫化水素の生成：あり（システイン添加肉汁）

炭水化物の発酵性：上記いずれの炭水化物からも酸およびガスの生成なし

アラビノース、キシロース、グルコース、マンノース

(4)

に生育することなどから、アースロバクター（*Arthrobacter*）属に所属すると考えられる。さらに同書記載の既知の種（Species）について検索するとクロモゲニツクで、澱粉を分解せず、硝酸塩を還元せず青色を呈することなどからアースロバクター・ウレアファシエンス（*Arthrobacter ureafaciens*）と推定される。本菌種について記載された菌学的性質と前記7116菌の菌学的性質とを対比させるときわめてよく合致し、記載事項と異なる点はない。

したがって7116菌はアースロバクター・ウレアファシエンス（*Arthrobacter ureafaciens*）クレブスおよびエグレストン（Krebs and Eggleston）（1939）、クラーク（Clark）（1955）と命名された。

原料としては、キクイモとかゴボウなどイヌリン含有量の多い小科植物の根または地下茎、あるいは抽出液でも市販イヌリンでもよいが、いかにしてもかかるイヌリンを溶解に本菌株を接種して培養する。培養温度は37℃が最もし

い。DFA ■ の生成は旋光度により追跡することが可能である。というのはイヌリン水溶液は左旋性であるが、DFA ■ は強く右旋性であるからである。したがって旋光度が強く右旋性になりやがて一定になるところで消化を加熱によつて停止せればよい。通常かかる培養に要する時間は5〜10日である。もちろん消化中の旋光度測定はすべてが標準化されるから必要でない。

これをハイフロス パーセル（和光純薬工業）などの過渡促進剤を加えて経過することにより菌体を除去したのち、パン酵母を加えてDFA ■ 以外のフルクトースや他のオリゴ糖を発酵させてのぞくことがDFA ■ の純度を高めるために有効である。発酵終了後パン酵母も過渡促進剤を加えて分別する。なおこれらの操作過程中の微生物除去はもちろん過心分離操作でも置き換えられる。この母液を濃縮し活性炭カラムクロマトグラフィーにより活性炭カラムに吸着させたのち、5%エタノール水溶液にて溶出される分画中にDFA ■ が含まれてくる。これを濃縮し

(7)

つぎに実施例をあげて本発明の方法をさらに具体的に説明する。

実施例 1

市販のゴホウを洗浄後、200gを細断し、蒸留水500mlを加え、1時間煮沸抽出する。冷却後ガーゼで濾過し、母液をうる。この母液を1% NaOHにてpH 7.0に調整したのち、減圧フラスコに移し、これを120℃、2気圧の条件で30分間高圧滅菌する。この滅菌した抽出液に7115菌を数白金耳接種し、37℃で静置培養する。培養中適時に滅菌した注射器により、培養液を5ml取り出し、取り出した液を遠心処理し、上澄液を加熱処理したのち、DFA ■ の生成量を把握するために旋光度を測定する。右旋性が増しやがて一定になつてくる。このとき消化を止める。6日後に培養液は1.5gのハイフロスパーセルが加えられ、吸引濾過され、菌体が除去される。この母液は10分間煮沸して酵素を失活させたのち、これに約20gのパン酵母を加え、2時間静置したのち、ハイフロ

(9)

特開昭49-117688 (3)

固して所期のDFA ■ をうる。また別法として前記方法により消化終了せしめた培養液を硫酸(65%飽和)を加え析出した沈殿を数回濾過し、その母液を透析したのち、凍結乾燥することにより本菌種により産生したイヌリン分解酵素(以下粗酵素とす)がえられる。この粗酵素の至適pHは6.5〜7.5であり、イヌリンに特異的に作用する。したがって粗酵素にpH 7.0に調整した緩衝液中で市販イヌリンを作用させることによつて所期のDFA ■ を生成してもよい。

このものは甘味(シヨ糖の約半分)を有し、このままでは還元力がなく、酸による加水分解によつてフルクトースが生成してくる。水によく溶ける。

旋光度 $[\alpha]_D^{20} = 136^\circ$ 、融点 162°C

薄層クロマトグラフィーによるRf値はアビセロシド(ワタコシ製薬株式会社)、n-ブタノール:ヒリジン:水=6:4:3の条件で0.63〜0.64であり、DFA ■ の標準物質のそれとよく一致した。

(8)

ハイフロスパーセルを加えて吸引濾過される。この母液の70mlにまで減圧濃縮する。この液は活性炭カラム(2.5cmの径、45cmの高さのカラムであり、活性炭30gとセライト6535の60gの混合物を蒸留水にて充填)に吸着させ、蒸留水1.3ℓを流したのち、5%エタノール水溶液で溶出する。溶出液は15mlごとに取り出され、旋光度にてDFA ■ 量を測定する。その溶出ピーク(6〜15〜650の間)を集めて、減圧濃縮して乾固する。収量0.5g、 $[\alpha]_D^{20} = 126.5^\circ$

元素分析値

理論値(%): C 44.44 H 6.17

実験値(%): C 44.15 H 6.20

融点 $154 \sim 155^\circ\text{C}$

実施例 2

風乾したキクイモを洗浄後、150gを細断し蒸留水650mlにて、1時間煮沸抽出する。冷却後ガーゼで濾過し、母液をうる。この母液を1% NaOHにてpH 7.0に調整したのち、滅菌フラスコに移し、これを120℃、2気圧という条件で20

分間高圧滅菌する。この滅菌した抽出液に 7116 菌を数白金耳接種し、37℃にて静置培養する。実施例 1 と同様に適時旋光度の測定をする。9 日後に培養液は 1.5g のハイフろスーパーセルが加えられて吸引濾過され、菌体が除去される。この濾液から 100ml をとり、10 分間加熱し酵素を失活させ、これに約 15g のパン酵母を加え、2 時間静置したのち、ハイフろスーパーセルを加えて吸引濾過される。この濾液の 50ml を約 10 ml にまで減圧濃縮する。この液は活性炭カラム（実施例 1 と同じもの）に吸着させ、蒸留水 1.3 l を流したのち、5% エタノール水溶液で溶出する。溶出液は 15ml ごとに集められ、旋光度にて DFA Ⅲ量を測定する。その溶出ピーク（No 10 ～ No 50 の分画）を集めて減圧濃縮にて乾固する。収量 0.5g、 $[\alpha]_D^{20} = 127.3^\circ$

元素分析値：

理論値 (%) : C 44.44 H 6.17

実測値 (%) : C 44.20 H 6.20

融点 155 ～ 156℃

01

$[\alpha]_D^{20} = 128.2^\circ$

元素分析値：

理論値 (%) : C 44.44 H 6.17

実測値 (%) : C 44.15 H 6.10

融点 158℃

実施例 4

1 l の蒸留水中に 15g のイヌリン、2g の NaNO_3 、0.5g の $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.5g の KOL 、0.5g の KH_2PO_4 および数 mg の FeOL_3 を溶かした溶液に 2N の NaOH にて pH 7.0 に調整したのち、120℃、2 気圧という条件で 20 分間高圧滅菌する。この滅菌した溶液に 7116 菌を数白金耳接種し、37℃で静置培養する。培養中は実施例 1 と同様に適時旋光度の測定で DFA Ⅲの生成を測定する。5 日後に培養液は 2g のハイフろスーパーセルが加えられ吸引濾過され、菌体が除去される。これを 10 分間加熱し酵素を失活させたのち、これに 20g のパン酵母を加えて 2 時間静置する。その後、遠心分離によつて酵母をのぞいたのち、200ml の上澄液をとり、減圧濃縮にて約 10ml にしてから、実

03

特開 昭49-117688 (4)

実施例 3

実施例 2 で消化終了した培養液を 300ml とし、硫酸を 65g (65% 飽和) 攪拌しながら加え、一夜冷蔵庫中に放置する。析出する沈殿にハイフろスーパーセル 5 g を加えて攪拌したのち、吸引濾過する。この濾過残渣を 20ml の水に浮遊させ 15 分間振盪する。これを濾過してなお残渣を少量の水で洗ったのち、濾液をセロハンチューブ内で 24 時間蒸留水に対して冷蔵庫中で透析してから、凍結乾燥する。これで粗酵素が 30mg えられる。

市販イヌリン 2 g を 100ml の 0.1 モル酢酸緩衝液に溶かし、さきの粗酵素を加えて、一度 65℃に 10 分間加熱し、いわゆるイヌラーゼを失活させたのち、トルエンを上層に少量を加えて 30℃にて 6 日間静置する。その後パン酵母を 10 g 加えて 37℃、2 時間保つ。その後ハイフろスーパーセルを 1 g 加えて吸引濾過したのち、濾液を減圧濃縮する。これを先の例と同様活性炭カラムで操作し、DFA Ⅲを 0.5g うる。

02

実施例 1 と同じ活性炭カラムに吸着させる。蒸留水を 1.3 l 流したのち、5% エタノール水溶液で溶出する。溶出液は 15ml ごとに集められ、旋光度にて DFA Ⅲ量を測定する。その溶出ピーク（No 10 ～ No 55 の分画）を集めて減圧濃縮にて乾固する。収量 0.7g、 $[\alpha]_D^{20} = 127.0^\circ$

元素分析値：

理論値 (%) : C 44.44 H 6.17

実測値 (%) : C 44.35 H 6.15

融点 158℃

特許出願人 科研薬化工株式会社

代理人 弁理士 朝 日 奈 宗 太

00

(2) 委任状 1通

(3) 特許法第30条第1項適用申請書 1通

(4) 特許願 願本1冊

特開昭49-117688(5)
手続補正書(自発)

昭和48年6月29日

特許庁長官 三 宅 幸 夫 殿

6 前記以外の発明者

住 所 トヨカシアサヒガカ
大阪府豊中市旭ヶ丘10
氏 名 ウチヤマ タカ オ
内 山 泰 夫
住 所 アカシシコクボ
兵庫県明石市小久保197
氏 名 イトワ アキ ヒコ
伊 藤 明 彦

1 事件の表示

昭和48年特許願第31086号

2 発明の名称

ジフルクトース・ジアンヒドリドの製造法

3 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所 東京都中央区日本橋本町4の7
カケンヤクカコウ
名 称 科 研 薬 化 工 株 式 会 社
ヒダカケイソウ
代 表 者 肥 高 恵 造

4 代 理 人

住 所 大阪市北区龍城町2の28 新千代田ビル
氏 名 (6522) 弁護士 朝 日 奈 宗 太

(2)

(1)

5 補正の対象

本件願書に添付された明細書の「発明の詳細な説明」の欄

6 補正の内容

本願明細書、3頁の11～13行「微生物保管委託申請受理番号1969号のもとに工業技術院微生物工業技術研究所に委託申請されている」の記載を「寄託番号(微工研南寄第1969号)のもとに工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されている」と補正する。

7 添付書類の目録

(1) 微生物受託番号通知書(写) 1冊

以 上

(2)

⑬ 特 許 公 報 (B2)

昭56-26400

⑤ Int.Cl.³

識別記号

庁内整理番号

②④公告 昭和56年(1981) 6月18日

C 12 P 19/14
C 12 N 9/24
C 12 P 19/12
(C 12 P 19/14)
C 12 R 1/06

7115-4B
7349-4B
7115-4B

発明の数 1

(全5頁)

1

2

⑥ジフルクトース・ジアンヒドリドⅡの製造法

①特 願 昭48-31086

②出 願 昭48(1973) 3月17日

特許法第30条第1項適用 「Biochemica et
Biophysica Acta Emzymology」第284巻
(1972)(オランダ)第248~256頁

公 開 昭49-117688

④昭49(1974) 11月11日

⑦発 明 者 田中国治

豊中市刀根山4の4

⑧発 明 者 内山喬夫

豊中市旭ヶ丘10

⑨発 明 者 伊藤明彦

明石市小久保197

⑪出 願 人 科研薬化工株式会社

東京都中央区日本橋本町4の7

⑭代 理 人 弁理士 朝日奈宗太

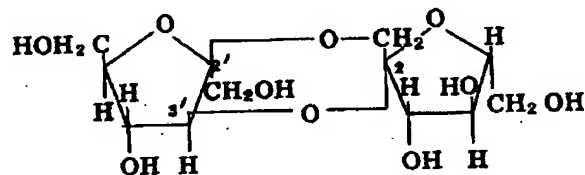
⑦特許請求の範囲

1 イヌリンまたはイヌリン含有植物抽出液を原料とし、アースロバクター・ウレアファシエンスに属する細菌またはその産生する酵素を利用することを特徴とするジフルクトース・ジアンヒドリドⅡの製造法。

発明の詳細な説明

本発明はイヌリンまたはイヌリン含有植物抽出液より微生物またはその産生する酵素を利用してジフルクトース・ジアンヒドリドⅡ(以下DFAⅡ重という)を高収率で製造する方法に関する。

DFAⅡは次式で示される構造を有する二糖類であり、



ジ-D-フルクトフラノース1・2':2・3'
ジアンヒドリド

10 ジャクソン(Jackson)ら(Bur・Stand. J. Res., 6, 709, 1931参照)により単離同定されている。この物質は相当の甘味を有し、同時に前記構造からも推定されるように他の糖類に比較して安定であり、動物体内では代謝されない。したがってノンカロリー甘味剤として注目されているものであり、糖尿病用もしくは美容食用などの用途に有用である。

イヌリンはフルクトースのみを構成糖とする多糖類である。ジャクソンらのはかかるイヌリンの酸による加水分解物からDFAⅡを単離しているが、その収率は2%弱であり、ほとんどがフルクトースである。したがってかかるイヌリンの酸分解法は、少なくともDFAⅡの製造法としては適切なものではない。

25 本発明者らはこれらの点を解決すべく種々研究を重ねた結果、ある種の微生物を用いることによりイヌリンおよびイヌリン含有植物抽出液より高収率でDFAⅡがえられることを見出した。

この菌は兵庫県明石市小久保の土壌より分離されたもので通常のイヌラーゼのようにイヌリンをフルクトースまで直接分解する作用を有する酵素とは異なる型のイヌリン分解酵素を産生する。しかしこの菌またはこの菌が産生するイヌリン分解酵素によりイヌリンを消化することによつて

35 DFAⅡを高収率でうるができる。この菌種(仮称7116菌)はまた寄託番号(微工研菌寄第1969号)のもとに工業技術院微生物工業技

術研究所に寄託されている。以下7116菌の菌学的性質を列挙する。

(1) 形態的性質

形態：0.1～0.2×1.0～1.5 μの桿菌

孢子：形成しない

ペン毛：なし

グラム染色：弱い陽性

抗酸性：なし

(2) 培養的性質

肉汁ゼラチン穿刺培養：液化する

寒天集落：円形、丘状、平滑、全円、光沢あり、
バター状、不透明、鈍い黄色

寒天斜面：中等度の生育、糸状、光沢あり、バ
ター状、鈍い黄色

肉汁：中等度の生育

ジャガイモ：中等度の生育

リトマスミルク：不変

BCPミルク：不変

(3) 生理的性質

好気性

30℃で良好な生育を示す

インドールの生成：なし

硫化水素の生成：あり（システイン添加肉汁）

炭水化物の発酵性：下記いずれの炭水化物から
も酸およびガスの生成なし

アラビノース、キシロース、グルコース、マン
ノース、フラクトース、ガラクトース、ラク
トース、マルトース、サツカーロース、トレハ
ロース、ラフィノース、ソルビット、イノシッ
ト、グリセロール、サリシン、α-メチルグル
コシッド、イヌリン、デキストリン、澱粉、セ
ルロース

アセチルメチルカルビノールの生成：なし

澱粉の分解性：なし

硝酸塩の還元性：あり

アンモニアの生成：なし

メチルレッド反応：陰性

クエン酸の利用性：あり（クリステンセン培地）

アンモニウム塩の利用性：あり（フツカー培地）

メチレンブルーの還元性：なし

2,6-ジクロロフェノールインドフェノール
の還元性：あり

カゼインの分解性：あり

カタラーゼの生成：あり

以上の諸性状にしたがい、バージェイのマニユ
アル・オブ・デターミネイティブ・バクテリオロ
ジー（Bergey's Manual of Determinative
Bacteriology）、第7版（1957）により検
5 索すると本菌はグラム弱陽性の桿菌で糖から酸の
生成がなく、ゼラチンを液化し、フツカー培地に
生育することなどから、アースロバクター
（*Arthrobacter*）属に所属すると考えられる。
さらに同書記載の既知の種（Species）について
10 検索するとクロモゲニクで、澱粉を分解せず、
硝酸塩を還元せず黄色を呈することなどからア
ースロバクター・ウレアファシエンス（*Arthro*
bacter ureafaciens）と推定される。本菌種に
ついて記載された菌学的性質と前記7116菌の
15 菌学的性質とを対比させるときわめてよく合致し、
記載事項と異なる点はない。

したがって7116菌はアースロバクター・ウ
レアファシエンス（*Arthrobacter ureafaciens*）
〔クレブスおよびエグレストン（Krebs and
20 Eggleston）（1939）；クラーク（Clark）
（1955）〕と同定された。

原料としては、キクイモとかゴボウなどイヌリ
ン含有量の高いキク科植物の根または地下茎の熱
湯抽出物でも市販イヌリンでもよいが、いずれに
25 してもかかるイヌリン水溶液に本菌株を接種して
培養する。培養温度は37℃が望ましい。DFA
Ⅲの生成は旋光度により追跡することが可能であ
る。というのはイヌリン水溶液は左旋性であるが、
DFAⅢは強い右旋性であるからである。したが
30 って旋光度が強く右旋性になりやがて一定になる
ところで消化を加熱によつて停止させればよい。
通常かかる培養に要する時間は5～10日である。
もちろん消化中の旋光度測定はすべてが標準化さ
れるなら必要でない。

35 これをハイフロスーパーセル（和光純薬工業株
製）などの戸過促進剤を加えて戸過することによ
り菌体を除去したのち、パン酵母を加えてDFA
Ⅲ以外のフルクトースや他のオリゴ糖を発酵させ
てのぞくことがDFAⅢの純度を高めるために有
40 効である。発酵終了後パン酵母も戸過促進剤を加
えて戸別する。なおこれらの操作過程中的微生物
除去はもちろん遠心分離操作でも置き換えられる。
この戸液を濃縮し活性炭カラムクロマトグラフイ
ーにより活性炭カラムに吸着させたのち、5%エ

5

タノール水溶液にて溶出される分画中にDFAM
があらわれてくる。これを濃縮乾固して所期の
DFAMをうる。また別法として前記方法により
消化終了せしめた培養液を硫安(65%飽和)を
加え析出した沈殿を数回再過し、その再液を透析
したのち、凍結乾燥することにより本菌種により
産生したイヌリン分解酵素(以下粗酵素という)
がえられる。この粗酵素の至適 pH は6.5~7.5
であり、イヌリンに特異的に作用する。したがつ
て粗酵素に pH : 7.0 に調整した緩衝液中で市販 10
イヌリンを作用させることによつて所期の DFAM
を生成してもよい。

前記酵素はつぎのごとき性質を有する。

(1) 作用

基質の水素および電子以外の原子団を水以外 15
の化合物(受容体)に転移する転移酵素に分類
されるものであり、イヌリンに作用して
DFAMを生産する。

(2) 基質特異性

イヌリンに特異的に作用する。 20

(3) 作用至適 pH

6.5~7.5

(4) 作用至適温度

50℃

(5) pH 安定性

pH 4~11 で安定であり、pH 3 で失活す
る。最も安定な pH 範囲は6~7である。 25

(6) 温度安定性

50℃まで安定であり、60℃をこえると急
激な失活がはじまり、75℃で完全に失活する。30

(7) 阻害

Hg^{2+} 、 Cu^{2+} および Pb^{2+} が阻害作用を
有し、とくに Hg^{2+} が阻害作用が強い。 Co^{2+} 、
 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、シス테인、
EDTAなどはほとんど阻害作用を示さない。 35

(8) 酵素活性測定法

酵素液 2.0 ml、0.2 M酢酸塩緩衝液(pH6.0)
1.0 mlおよび4重量%イヌリン(試薬特級)水
溶液 1.0 mlを37℃で10分間予備培養後よく
混合し、これをただちに0.1 dm角型セルに入
れ、旋光度計で37℃において酵素反応による
旋光度の変化量を測定する。

前記条件下において、反応混合液中に1 μ モ
ルのDFAMが生成すると、計算上旋光度が

6

+0.001° 変化することになるので、前記条
件で1分間に+0.001°の旋光度の変化を起
こす酵素量を1単位とする。比活性は酵素単位/
mg蛋白とする。

5 (9) 酵素精製法

(I) 硫安塩析でえられた前記粗酵素2gを100
mlの蒸留水に入れてよく攪拌し、少量の不溶性
物を遠心分離により除いた。0°~5℃に保つた
上清に1.5倍量(容量)の-10℃に冷却した
アセトン少量ずつ攪拌しながら加えた。生じ
た沈殿を10000G、0℃、15分の条件で
遠心分離して集め、冷アセトン、冷エチルエー
テルで洗浄後、塩化カルシウム上減圧デシケ
ター内に保存し乾燥した(以下、これをアセト
ン沈殿酵素という)。収量は約75mgであつた。

(II) 前記(I)でえられたアセトン沈殿酵素をセフ
アデックス(Sephadex)G-100(ファルマシ
ア社製架橋デキストラン、粒子径40~120
 μm を用いるゲル再過法で精製した。

0.05 M酢酸塩緩衝液(pH 6.0)と平衡化
したセフアデックスG-100のカラム(3.2
cm×60 cm)を調製した。アセトン沈殿酵素
50mgを0.05 M酢酸塩緩衝液(pH 6.0)2
mlに溶解し、試料溶液とした。0.05 M酢酸塩
緩衝液(pH 6.0)を溶出液として上昇法に
よるゲル再過を行なつた。流速は10 ml/hr
とし、溶出液を3mlずつ集めた。酵素活性の高
いフラクションを集め、冷蔵庫に保存した(以
下、これをセフアデックスG-100酵素とい
う)。

セフアデックスG-100酵素はポリアクリ
ルアミドディスクゲル電気泳動で単一のバン
ドを示した。

(III) 各精製段階における酵素の比活性と回収率
を次表に示す。

酵 素	比 活 性 (単位/mg蛋白)	回収率 (%)
培養液上澄	1	100
硫安沈殿酵素	8	71
アセトン沈殿酵素	49	53
セフアデックスG-100酵素	162	43

本発明の方法により得られるDFAⅢは甘味(シヨ糖の約半分)を有し、このままでは還元力がなく、酸による加水分解によつてフルクトースが生成してくる。水によく溶ける。

旋光度 $[\alpha]_D^{15} = 13.6^\circ$ 、融点 16.2°C

薄層クロマトグラフィーによるRf値はアゼセル-SF(フナコシ薬品(株)販売)、n-ブタノール:ピリジン:水=6:4:3の条件で0.63~0.64であり、DFAⅢの標準物質のそれとよく一致した。

つぎに実施例をあげて本発明の方法をさらに具体的に説明する。

実施例 1

市販のゴボウを洗浄後、200gを細断し、蒸留水500mlを加え、1時間煮沸抽出する。冷却後ガーゼで濾過し、濾液をうる。この濾液を1NのNaOHにてpH7.0に調整したのち、滅菌フラスコに移し、これを 120°C 、2気圧の条件で20分間高圧滅菌する。この滅菌した抽出液に7116菌を数白金耳接種し、 37°C で静置培養する。培養中適時に滅菌した注射器により、培養液を取り出し、とり出した液を遠沈処理してその上澄液を加熱処理したのち、DFAⅢの生成量を把握するために旋光度を測定する。右旋性が増しやがて一定になつてくる。このときに消化を止める。6日後に培養液は1.5gのハイフろスーパーセルが加えられ、吸引濾過され、菌体が除去される。この濾液は10分間煮沸して酵素を失活させたのち、これに約20gのパン酵母を加え、2時間静置したのち、ハイフろスーパーセル2gを加えて吸引濾過される。この濾液の70mlを約10mlにまで減圧濃縮する。この液は活性炭カラム(2.5cmの径、45cmの高さのカラムであり、活性炭30gとセライト65.35の60gの混合物を蒸留水にて充填)に吸着させ、蒸留水1.3lを流したのち、5%エタノール水溶液で溶出する。溶出液は15mlごとに集められ、旋光度にてDFAⅢ量を測定する。その溶出ピーク(65~650の分面)を集めて、減圧濃縮にて乾固する。収量0.5g、 $[\alpha]_D^{20} = 12.6.5^\circ$

元素分析値:

理論値(%): C 44.44 H 6.17

実測値(%): C 44.15 H 6.20

融点 $15.4 \sim 15.5^\circ\text{C}$

前記でえられた粗製品をさらに前記活性炭カラムにより1回精製したところ、標準物質と旋光度および融点がよく一致するものがえられた。

実施例 2

5 風乾したキクイモを洗浄後、150gを細断し蒸留水650mlにて、1時間煮沸抽出する。冷却後ガーゼで濾過し、濾液をうる。この濾液を1NのNaOHにてpH7.0に調整したのち、滅菌フラスコに移し、これを 120°C 、2気圧という条件で20分間高圧滅菌する。この滅菌した抽出液に7116菌を数白金耳接種し、 37°C にて静置培養する。実施例1と同様に適時旋光度の測定をする。9日後に培養液は1.5gのハイフろスーパーセルが加えられて吸引濾過され、菌体が除去される。この濾液から100mlをとり、10分間加熱し酵素を失活させ、これに約15gのパン酵母を加え、2時間静置したのち、ハイフろスーパーセルを加えて吸引濾過される。この濾液の50mlを約10mlにまで減圧濃縮する。この液は活性炭カラム(実施例1と同じもの)に吸着させ、蒸留水1.3lを流したのち、5%エタノール水溶液で溶出する。溶出液は15mlごとに集められ、旋光度にてDFAⅢ量を測定する。その溶出ピーク(65~650の分面)を集めて減圧濃縮にて乾固する。

収量0.5g、 $[\alpha]_D^{20} = 12.7.3^\circ$

元素分析値:

理論値(%): C 44.44 H 6.17

実測値(%): C 44.20 H 6.20

融点 $15.5 \sim 15.6^\circ\text{C}$

前記でえられた粗製品をさらに前記活性炭カラムにより1回精製したところ、標準物質と旋光度および融点がよく一致するものがえられた。

実施例 3

35 実施例2で消化終了した培養液を300mlとり、硫酸を65g(65%飽和)攪拌しながら加え、一夜冷蔵庫中に放置する。析出する沈殿にハイフろスーパーセル5gを加えて攪拌したのち、吸引濾過する。この濾過残渣を20mlの水に浮遊させ15分間振盪する。これを濾過してなお残渣を少量の水で洗ったのち、濾液をセロハンチューブ内で24時間蒸留水に対して冷蔵庫中で透析してから、凍結乾燥する。これで粗酵素が30gえられる。

9

市販イヌリン2gを100mlの0.1モル酢酸緩衝液に溶かし、さきの粗酵素を加えて、一度65℃に10分間加温し、いわゆるイヌラーゼを失活させたのち、トルエンを上層に少量を加えて30℃にて6日間静置する。その後パン酵母を10g加えて37℃、2時間保つ。その後ハイフロスーパーセルを1g加えて吸引ろ過したのち、ろ液を減圧濃縮する。これを先の例と同様活性炭カラムで操作し、DFAⅢを0.5gうる。

$$[\alpha]_D^{20} = 128.2^\circ$$

元素分析値：

理論値(%)：C 44.44 H 6.17

実測値(%)：C 44.15 H 6.10

融点 158℃

前記でえられた粗製品をさらに前記活性炭カラムにより1回精製したところ、標準物質と旋光度および融点がよく一致するものがえられた。

実施例 4

1ℓの蒸留水中に15gのイヌリン、2gのNaNO₃、0.5gのMgSO₄・7H₂O、0.5gのKCL、0.5gのKH₂PO₄および数mgのFeCL₃を溶かした溶液に2NのNaOHにてpH7.0に調整したのち、120℃、2気圧という条件で20

10

分間高圧滅菌する。この滅菌した溶液に7116菌を数白金耳接種し、37℃で静置培養する。培養中は実施例と同様に適時旋光度の測定でDFAⅢの生成を測定する。5日後に培養液は2gのハイフロスーパーセルが加えられ吸引ろ過され、菌体が除去される。これを10分間加熱し酵素を失活させたのち、これに20gのパン酵母を加えて2時間静置する。その後、遠心分離によつて酵母をのぞいたのち、200mlの上澄液をとり、減圧濃縮にて約10mlにしてから、実施例1と同じ活性炭カラムに吸着させる。蒸留水を1.3ℓ流したのち、5%エタノール水溶液で溶出する。溶出液は15mlごとに集められ、旋光度にてDFAⅢ量を測定する。その溶出ピーク(Ⅲ10～Ⅲ55の分画)を集めて減圧濃縮にて乾固する。収量0.7g、 $[\alpha]_D^{20} = 127.0^\circ$

元素分析値：

理論値(%)：C 44.44 H 6.17

実測値(%)：C 44.35 H 6.15

融点 158℃

前記でえられた粗製品をさらに前記活性炭カラムにより1回精製したところ、標準物質と旋光度および融点がよく一致するものがえられた。